

平成 21 年 4 月 13 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591535

研究課題名 (和文) プロテオミクスによる大腸癌に対する分子標的治療のテーラーメイド化

研究課題名 (英文) Tailoring molecular targeted therapy for colon cancer by proteomic analysis

研究代表者

大村 健二 (OMURA KENJI)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：30194301

研究成果の概要：

大腸癌細胞株を移植したマウスに分子標的治療を行った。血清蛋白質を用いてマスマスペクトラムおよび2次元電気泳動により蛋白発現解析を行った。治療開始後早期、中期、後期においてマスマスペクトラムおよび蛋白発現レベルに変化がみられた。腫瘍の大きさは、開始早期には減少、中期には不変、後期には増大がみられ、血清蛋白の変化と治療効果は密接に関連していると思われた。現在、これら蛋白質の同定を試みている。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：大腸癌, プロテオミクス, 分子標的治療, テーラーメイド, バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍に対する治療として従来の抗癌剤とは異なり、特定の蛋白質あるいはその活性化を標的とした様々な分子標的治療薬が開発されてきた。実際に臨床の現場にて使用されるようになると、以下の問題点が明らかになってきた。

(1) 治療効果の期待できる患者を事前に選択できない。

分子標的治療薬の効果は、基礎研究段階では標的蛋白質の発現量あるいはその活性化の

程度と相関するといわれてきた。しかし、実際に臨床現場にて使用されると、特に大腸がん、肺癌では、標的蛋白質の発現量あるいは活性化と治療効果は相関しないことが明らかとなった。治療効果が予想される患者の選択は、効果の期待できない患者に治療を施す無駄を省き、患者個人にあった治療法の選択、いわゆるテーラーメイド治療の観点から必要とされる。

(2) 治療効果を判定、モニターするためのサロゲートマーカーがない。

分子標的治療薬が生物学的に効果をもたら

しているのか否かを投与後速やかに評価し、モニターしていくサロゲートマーカーの発見が、患者個人の治療開始後の効果の評価、投薬量の評価、いずれ生じる耐性の速やかな発見といったテーラーメイド化の観点から期待されている。

(3) 長期間治療を継続することにより治療耐性が生じてくる。当初効果の見られた分子標的治療薬でも、長期間投与することで一般に耐性を生じてくることが明らかとなり問題となっている。一旦耐性を生じると分子標的治療の効果は失われ、腫瘍が再び増殖してしまうことから、患者個人により異なると予想される耐性のメカニズムの解明と克服が、治療のテーラーメイド化の観点から一刻も早く期待されている。

2. 研究の目的

分子標的治療による効果をより有効なものとするために、これらの3つの問題点を克服することが必要である。

3. 研究の方法

(1) および (2) : ヒト大腸がん細胞株を皮下移植して作成したマウスモデルを以下の治療群に分類の後、実際に治療を施行した。

①コントロール治療群 (Control) : DMSO 週3回腹腔内投与、9週間継続。

②単回治療群

AR-Once :

DMSO を週3回腹腔内投与するコントロール治療を継続し分子標的薬 (GSK 阻害剤 AR) を治療最終日に1回のみ腹腔内投与。

GSKI-1 : GSKI による分子標的治療を初回1回のみ施行し残りの治療はコントロール治療を9週まで施行。

③分子標的治療薬治療群

AR-7weeks :

分子標的治療薬 (AR) を週3回7週間腹腔内投与。治療終了後翌日に麻酔下にすべてのマウスより採血、腫瘍を摘出し重量を測定した。GSKI-9w : GSKI による分子標的治療を9週まで施行した。治療終了後翌日に麻酔下にすべてのマウスより採血、腫瘍を摘出し重量を測定した。

得られた血清蛋白質を用いて2次元電気泳動および Surface Enhanced Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometer (SELDI-TOF-MS)により蛋白質

現解析を行った。

2次元電気泳動用蛋白質サンプルは全蛋白質とリン酸化蛋白質をカラムを用いて生成したものの2種類を準備した。これにより治療効果と相関する蛋白質発現、リン酸化蛋白質発現の変化を検出する。

(3) 分子標的治療薬に対して感受性のある大腸癌細胞株から耐性を獲得したサブクローンを樹立し、耐性を獲得する前後での蛋白質の発現の差異をディファレンシャルディスプレイ法で比較する。耐性株に特異的に発現してくる蛋白質を同定する。

4. 研究成果

(1) および (2) :

Summary :

2次元電気泳動による解析

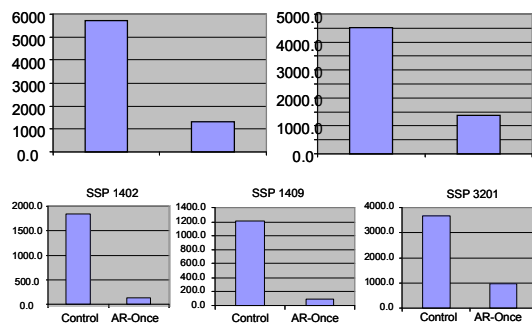
コントロール治療群、分子標的治療1回治療群 (AR-Once)、分子標的治療群 (AR-7weeks) において血清蛋白質発現レベル、蛋白質リン酸化レベルに変化がみられた。

血清蛋白質マススペクトラムにも変化がみられた。

結果 : 2次元電気泳動

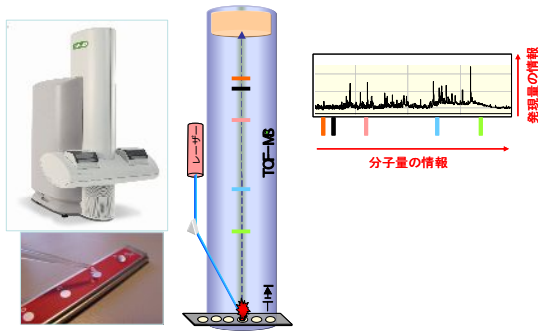
コントロールもしくは AR による分子標的治療にて、4つの蛋白質における発現レベルは治療群間にて変化がみられなかったが、リン酸化は7週にて減少していた。腫瘍重量は7週治療群にて有為に減少しており、これら4つの蛋白質のリン酸化は治療効果と相関するものと思われた。

治療群間にて蛋白質発現に変化のみられたスポットの定量結果



計12箇所 of 蛋白質スポットの発現量が治療群間で変化していた。上記グラフはその一部である。分子標的治療1回のみ (AR-Once) においてすでに血清中の蛋白質発現量に変化が見られた。

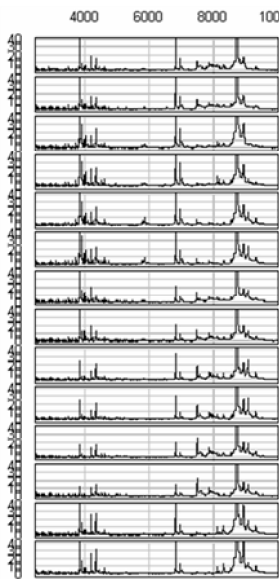
結果 : SELDI-TOF-MS



(プロテインチップと実際の装置)

蛋白質資料はプロテインチップ上に添付された後、レーザーにて励起され検出装置中を測定器に向かい飛行する。その飛行時間は資料中の蛋白質質量に比例し、その検出量は資料中の蛋白質の比率に比例する。結果は上記のごとく分子量を横軸、発現量を縦軸として示される (マススペクトラム)。

マウス血清蛋白解析の実例：



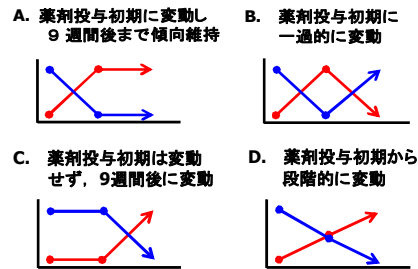
上記：14匹分資料のマススペクトラム

多群間解析 (ディファレンシャル解析)：

すべての波形 (ピーク) は自動的に検出され、その分子量、発現量が数値化される。多群間におけるすべてのピークの変化は統計学的に評価される。

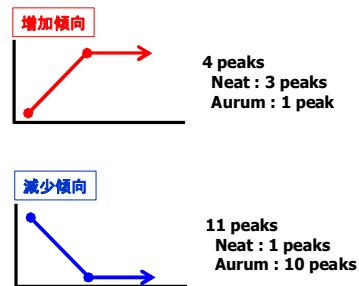
結果：

すべての同一ピークの治療による変化が比較され、統計的に有為に変化のみられたものは以下の4つのパターンに分類された。

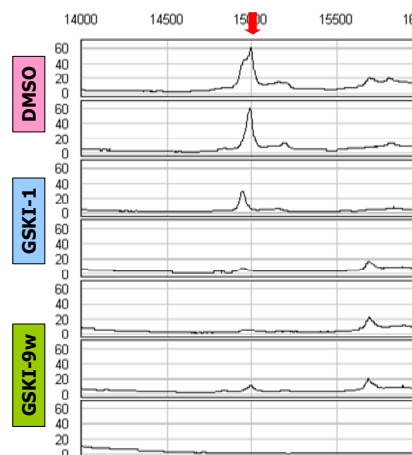


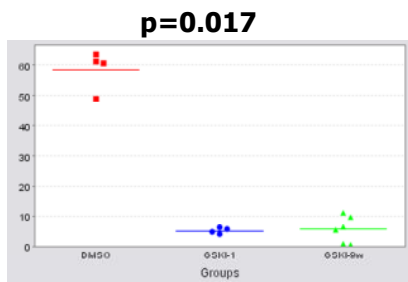
腫瘍重量はコントロール群、1回治療群と比較して治療9週目において有為に減少していた (C群と同様の変化)。

次にC群におけるピークの変化の実際を示す。9週目にピーク高 (発現量) が増加したの4ピーク、11ピークは発現量が減少した。

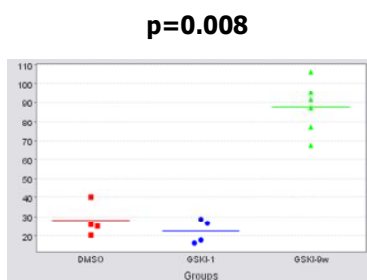
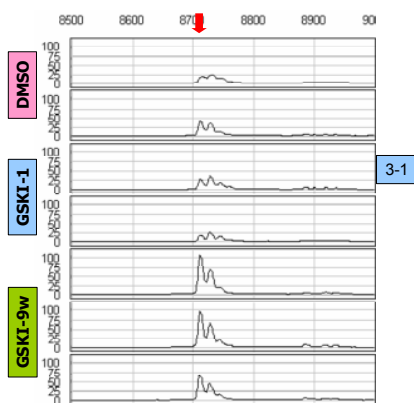


分子量15000の蛋白質ピークの変化の実例と発現量の変化の統計的解析：





分子量 8700 の蛋白質ピークの変化と発現量の変化の統計的解析：



他に多数のピークに変化がみられた。これらの蛋白質の中には9週目にて治療効果すなわち腫瘍重量と相関するものの他に、わずか1回の治療にて変化するものがみられた。これらの蛋白質の中には治療効果の予想の指標となるものが含まれていると予想される。また、治療後期すなわち9週目にて変化のみられる蛋白の中にはいずれ生じてくるであろう治療抵抗性と関連したものも含まれると予想された。

現在は、これらの2次元電気泳動および SELDI-TOF-MSにて得られた結果をもとに、治療効果と相関する蛋白、治療効果の予想につながる蛋白、治療抵抗性の指標になる蛋白の発見にむけて、候補蛋白質の精製、同定中である。途中経過はいずれ学会報告の予定である。

結果 (3) :

目的：分子標的治療薬に対して感受性のある大腸癌細胞株から耐性を獲得したサブクローンの樹立。

大腸癌細胞株から耐性を獲得したサブクローンを試みてきたが、培養液中の薬剤濃度を上げていくだけでは、十分な薬剤耐性能が得られなかった。現在、薬剤の変更、変異誘発物質の培養液への添加、多剤併用により再度培養を行っている。

5. 主な発表論文等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大村 健二 (OMURA KENJI)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：30194301

(平成19年10月1日まで研究代表者)

横井 健二 (YOKOI KENJI)

金沢大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00401919